



**TAYVIA LIZ MEYER**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PERCLORATOS  
EM *DAPHNIA MAGNA***



**TAYVIA LIZ MEYER**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PERCLORATOS  
EM *DAPHNIA MAGNA***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Patrícia Mendes Loureiro, Investigadora Auxiliar do CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro.



## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. António José Arsenia Nogueira**

Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Lúcia Maria das Candeias Guilhermino**

Professora Catedrática do ICBAS da Universidade do Porto

**Dr. Carlos Alexandre Sarabando Gravato**

Investigador auxiliar, CIIMAR, da Universidade do Porto

**Prof. Dr. Amadeu Mortágua Valho da Maia Soares**

Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Dr.<sup>a</sup> Susana Patrícia Mendes Loureiro**

Investigadora auxiliar, CESAM, Universidade de Aveiro



## **agradecimentos**

Agradeço à Professora Doutora Susana Loureiro pela orientação, compreensão, grandiosa ajuda, e dedicação.

Ao Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares por me ter apresentado o projecto.

Aos colaboradores do Laboratório de Ecologia e Toxicologia Ambiental do Departamento de Biologia, da Universidade de Aveiro, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos portugueses pela hospitalidade e oportunidade de conhecer e vivenciar à sua cultura diariamente.

Aos meus pais e irmãos, pela ajuda constante e pela possibilidade de encarar novos desafios.

Ao meu amado Luís, pelo apoio, ajuda, incentivo e por provar que não há tempo nem distância capaz de nos afastar.

## palavras-chave

Perclorato de amónia, perclorato de sódio, *Daphnia magna*, reprodução, inibição alimentar, sobrevivência, mistura química

## resumo

A contaminação ambiental provocada por percloratos provém principalmente de acções antropogénicas. Os danos causados pela contaminação química de percloratos ocorrem ao nível ambiental, como no solo e na água, com efeitos tóxicos em plantas, animais, mas também ao nível da saúde humana. No Homem, a exposição a perclorato tem um efeito na redução da captação de iodeto pela tiróide (hipertireoidismo), um importante regulador do metabolismo humano.

Devido aos níveis altos de oxidação, os percloratos são usados como propulsores sólidos para foguetes e projecteis, fogos de artifícios, “air-bags” e outras tantas finalidades. São compostos altamente solúveis em água e muito persistentes no ambiente.

Considerando a importância do uso de bioindicadores para avaliação da qualidade ambiental, neste estudo utilizou-se o microcústaceo *Daphnia magna* em bioensaios ecotoxicológicos para determinar os efeitos de percloratos.

Com o objectivo principal de avaliar os efeitos do perclorato de sódio, perclorato de amónia e da mistura binária destes compostos químicos em *Daphnia magna*, foram realizados testes ecotoxicológicos agudos e crónicos e avaliados parâmetros de imobilização, reprodução, crescimento e inibição alimentar.

Os resultados obtidos no teste de imobilização indicaram que a toxicidade letal do perclorato de amónio foi superior à do perclorato de sódio.

Nos testes crónicos de reprodução a toxicidade do perclorato de amónio foi semelhante à toxicidade do perclorato de sódio. Já no ensaio de avaliação da taxa alimentar, o perclorato de amónia foi mais tóxico para *Daphnia magna* quando comparado com o perclorato de sódio.

Nos testes realizados com misturas, foram possíveis observar três comportamentos distintos em três diferentes parâmetros, demonstrando que diferentes parâmetros podem originar diferentes resultados, pois tudo depende do modo de acção dos compostos químicos. O modelo conceptual CA (adição da concentração) só foi válido para um dos parâmetros (nº de neonatos), tendo nos outros dois apresentado um desvio dependente do químico ou das doses utilizadas.

Deste modo conclui-se que ambos os tóxicos (perclorato de amónio/perclorato de sódio), assim como a sua mistura, produzem danos nos diversos ecossistemas onde estiverem presentes.

**keywords**

Ammonium perchlorate, sodium perchlorate, *Daphnia magna*, reproduction, feeding inhibition, survival, mixtures.

**abstract**

Environmental contamination by perchlorates has its primer origin from anthropogenic procedures. Chemical contamination by perchlorates is observed in different environmental compartments like, water, soil and sediment, inducing effects on plants, animal and also in human health. In men the exposure to perchlorates reduces iodine caption by thyroid, which is the metabolism regular organ.

Due to the high oxidation levels, perchlorates are used as solid rocket propulsors, car airbags, and fertilizers, among other uses. These compounds are highly water soluble and are also considered persistent in the environment. In this study the cladoceran *Daphnia magna* was used as a bioindicator to evaluate water quality when contamination with perchlorates was present.

The main objective of this study was to evaluate the potential toxicity of sodium and ammonium perchlorates, singly and combined to *Daphnia magna*. Ecotoxicological assays were run using as endpoints: immobilization, feeding rates and reproduction.

The results indicate that lethal toxicity is higher to ammonium perchlorate than to sodium perchlorate. In the chronic tests, using reproduction as endpoint, both chemicals toxicity was similar. When studying feeding rates, ammonium perchlorate was more toxic than sodium perchlorate.

When testing the perchlorate binary mixture, we obtained three different patterns for response, depending on the parameter and test used: dose ratio dependency, for the immobilization test, dose level dependency for feeding inhibition test, and the conceptual model of Concentration addition for the number of neonates obtained in the long term exposure.

Both chemical compounds, singly and in mixture can impair ecosystems and cause potential hazard and risk.







## Índice

<b>Abreviaturas</b>	ii
<b>Lista de Figuras</b>	iii
<b>Lista de Tabelas</b>	iv
<b>1. Introdução</b>	1
1.1 O que é o perclorato	4
1.2 Considerações sobre os percloratos	4
1.3 Modo de acção dos percloratos	6
1.4 Objectivos do trabalho	8
<b>2. Materiais e Métodos</b>	9
2.1 Organismos- teste: <i>Daphnia magna</i>	11
2.2 Manutenção e cultivo de <i>D. magna</i>	11
2.3 Metodologia utilizada nos testes ecotoxicológicos	11
2.3.1 Princípio dos métodos utilizados	12
2.3.1.1 Teste de imobilização	13
2.3.1.2 Teste de reprodução	14
2.3.1.3 Teste de alimentação	15
2.3.2 Teste de sensibilidade	18
2.4 Análise estatística	19
2.4.1 Estatística dos testes de exposição isolada	19
2.4.2 Estatística dos testes de exposição em mistura	19
<b>3. Resultados</b>	23
3.1 Teste agudo – teste de imobilização	25
3.2 Teste crónico – teste de reprodução	26
3.3 Teste crónico – teste de alimentação	28
<b>4. Discussão</b>	33
<b>5. Referências</b>	39

## Abreviaturas

<b>ASTM</b>	American Standard of Testing and Materials
<b>CE</b>	Concentração inicial efectiva a 50% dos organismos
<b>CENO</b>	Concentração de efeito não observado
<b>CEO</b>	Concentração de efeito observado
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração inicial letal a 50% dos organismos
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency
<b>NaClO<sub>4</sub></b>	Perclorato de Sódio
<b>NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub></b>	Perclorato de Amónio
<b>OECD</b>	Organization for Economic Co-Operation And Development

## Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma dos testes agudo e crónico com as substâncias tóxicas.

Figura 2. Representação gráfica de *Daphnia magna* indicando o segmento medido para determinação do comprimento dos indivíduos (imagem adaptada de Ruppert, et al, 2004).

Figura 3. Curvas de dose-resposta para a sobrevivência de *Daphnia magna* exposta isoladamente e em mistura a perclorato de amónia e de sódio. O gráfico da esquerda apresenta uma simulação em 3D, e o da direita em 2D.

Figura. 4. Reprodução de *Daphnia magna* (número total de neonatos) após a exposição a perclorato de amónia durante 21 dias.\*  $P < 0.05$ , Método de Dunnett's, comparado com o controlo (0 mg/L).

Figura 5. Dáfnias expostas a  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$  durante 21 dias: a dáfnia da esquerda foi exposta ao meio de controlo, a dáfnia do centro à concentração de 100mg/L e a dáfnia da direita exposta a 200mg/L.

Figura. 6. Reprodução de *Daphnia magna* (número total de neonatos) após a exposição a perclorato de sódio durante 21 dias.\*  $P < 0.05$ , Método de Dunnett's, comparado com o controlo (0 mg/L).

Figura 7. Curvas de dose-resposta para a reprodução ( $n^\circ$  de neonatos) de *Daphnia magna* exposta isoladamente e em mistura a perclorato de amónia e de sódio. O gráfico da esquerda apresenta uma simulação em 3D, e o da direita em 2D.

Figura 8. Taxa de alimentação de *Daphnia magna* exposta durante 24h a perclorato de amónio. (\*-  $P < 0.05$ , teste Dunnett)

Figura 9. Taxa de alimentação de *Daphnia magna* exposta durante 24h a perclorato de sódio. (\*- $P < 0.05$ , teste Dunnett).

Figura 10. Curvas de dose-resposta para taxa de alimentação de *Daphnia magna* exposta isoladamente e em mistura a perclorato de amónia e de sódio. O gráfico da esquerda apresenta uma simulação em 3D, e o da direita em 2D.

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Toxicidade aguda de perclorato de amónio (PA) e perclorato de sódio (PS) em vários organismos aquáticos (adaptado de Liu, 2006). CL<sub>50</sub>- concentração que provoca mortalidade a 50% dos organismos expostos.

Tabela 2. Concentração de perclorato de amónio e perclorato de sódio em mistura utilizada no teste de imobilização com *Daphnia magna*.

Tabela 3. Concentrações nominais de perclorato de amónio e perclorato de sódio em mistura utilizada no teste de reprodução com *Daphnia magna*.

Tabela 4. Concentrações nominais de perclorato de amónio e perclorato de sódio em mistura utilizada no teste de alimentação com *Daphnia magna*.

Tabela 5. Interpretação dos parâmetros adicionados ao modelo conceptual de adição de concentração (a e b) que definem o padrão e a forma de desvio do modelo conceptual (adaptado de Jonker et al., 2005).

Tabela 6. Teste de imobilização do perclorato de amónio e perclorato de sódio, CL<sub>50</sub> – 24 horas e 48 horas







## 1. Introdução

Durante muitos séculos, e desde a revolução industrial e o acentuar do desenvolvimento económico e industrial, a humanidade tem causado um aumento da poluição atmosférica, da água e dos solos, alterando o clima na Terra, erodindo o solo, fragmentando e eliminando o habitat das plantas e animais (Harte, 2007).

Difícilmente encontraremos algum país, mesmo entre os mais desenvolvidos, que não tenha problemas relacionados com algum tipo de desequilíbrio ambiental. O constante descarte de poluentes no sistema aquático interfere directamente com toda a cadeia deste sistema, seja na fotossíntese, nos organismos terrestres e/ou aquáticos e/ou indirectamente com o ser humano. O sistema aquático representa uma grande parcela ambiental, abrigando 70% dos organismos, sendo reconhecido que as maiores fontes poluidoras deste sistema estão na descarga de esgotos domésticos e lixo industrial (Foth, 1999).

Diante disso, ressalta-se a importância de uma ciência como a ecotoxicologia que representa uma forte ligação entre toxicologia, ecologia, e o comportamento dos químicos (Demnerova et al., 2007), cujos avanços ajudam a esclarecer e minimizar possíveis dados oriundos de diversas fontes poluidoras, assim como desenvolver e expandir técnicas de detecção.

O objectivo da ecotoxicologia é estudar os efeitos perniciosos de compostos químicos nos ecossistemas, por meio da determinação dos efeitos agudos e crónicos de substâncias químicas antropogénicas nos organismos, e nas estruturas dos ecossistemas, bem como na diversidade de organismos, populações e comunidades (Foth, 1999)

O entendimento de como os compostos químicos agem nas funções fisiológicas de células, órgãos e indivíduos expostos a stressores químicos, auxiliam na elaboração dos conceitos toxicológicos básicos, os quais podem ser aplicados na compreensão dos efeitos negativos das substâncias químicas sobre os ecossistemas (Foth, 1999), pois a manutenção de riquezas de espécies é importante, mantendo assim a biodiversidade (EPA, 2002).

Nesta constante busca de informação e identificação de possíveis agentes causadores de stress, os testes ecotoxicológicos são valiosas ferramentas que auxiliam neste objectivo. Nestes testes, dentre outros organismos, são utilizados organismos bioindicadores, tais como invertebrados da comunidade aquática, que apesar de terem pouco valor directo na sociedade, são importantes na energia e dinâmica dos

ecossistemas aquáticos. Entre os organismos bioindicadores, o microcústáceo *Daphnia magna* é um organismo muito usado em ecotoxicologia, fornecendo dados úteis sobre a toxicidade de substâncias químicas, sendo então crucial nos processos de avaliação de risco ecológico para os sistemas aquáticos. O uso de *Daphnia magna* começou em 1933, com Einar Naumann. Depois disso, os testes com toxicidade com dáfnias têm sido desenvolvidos e usados para uma ampla gama de propósitos, incluindo ensaios de letalidade, reprodução, alimentação e comportamento para diversos compostos químicos e/ou em ensaios *in situ* ou mesmo para a avaliação da contaminação de sedimentos e solos (ex. Nikunen et Miettinen, 1985; Mc William and Baird, 2002; Loureiro et al. 2005; Damásio e tal. 2008).

### **1.1 O que é o perclorato**

O perclorato é um anião ( $\text{ClO}_4^-$ ) constituído por um átomo de cloro unido a quatro átomos de oxigénio (ITRC, 2005). Embora seja um forte oxidante, o anião perclorato é muito persistente no ambiente devido à alta energia de activação associada com a sua redução (Urbansky, 2002). O perclorato pode ocorrer naturalmente no ambiente ou ser proveniente de substâncias químicas artificiais.

O perclorato quando associado a um catião comum, como a amónia ( $\text{NH}_4^+$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ) ou potássio ( $\text{K}^+$ ), resulta em sais como: perclorato de amónia ( $\text{NH}_4\text{ClO}_4$ ), perclorato de potássio ( $\text{KClO}_4$ ) e perclorato de sódio ( $\text{NaClO}_4$ ), que são muito solúveis em água.

### **1.2 Considerações sobre o perclorato**

Actualmente os percloratos podem ser detectado em vários compartimentos ambientais (ex. aquático e terrestre). Inicialmente a sua ocorrência era supostamente indicada e delimitada apenas no deserto chileno de Atacama, porém, pesquisas conduzidas pelo USGS (United States Geological Survey) revelam uma forte ocorrência natural de fontes de percloratos nos EUA (ITRC, 2005), encontrados em

regiões áridas como por exemplo no estado do Texas (USFDA, 2007). Na Europa também foram detectados percloratos (Bausinger et al. 2007).

Actualmente, os Estados Unidos da América é um dos países que apresenta maior contaminação com percloratos, que foi detectado pelas agências federais e estatais em quase 400 locais dentro dos EUA (Tikkanen, 2006), sendo um contaminante ambiental frequentemente associado com instalações militares (Tikkanen, 2006). A maioria dos percloratos fabricados nos Estados Unidos são usados como ingredientes primários em propulsores sólidos de foguetes, também sendo usado em diversos processos indústrias e pirotécnicos (USFDA, 2007). São também usados em “air-bags” de automóveis e em fertilizantes agrícolas (DOD Perchlorate handbook, 2007). A ocorrência conjunta destes dois percloratos tem sido detectada em efluentes de indústrias de “air-bags”, em concentrações que poderão significar um risco para o ambiente ou para a saúde humana.

Os percloratos são sais com elevada solubilidade em água. Uma vez dissolvido em água, o perclorato é muito estável, resistindo à degradação no subsolo, não fazendo a adsorção a superfícies minerais de uma forma rápida. (DOD Perchlorate handbook, 2007).

Na revisão realizada por Bausinger et al. (2007) são encontradas citações sobre o uso de perclorato e clorato, pelos exércitos alemão e francês, como explosivo substituto na 1ª Guerra Mundial. Este facto explica também a ocorrência de clorato e de perclorato em lixiviados recolhidos de locais que foram utilizados para armazenar e ou enterrar munições. Existem evidências que sugerem que processos atmosféricos (por exemplo: raios) possam produzir percloratos (Dasgupta et al., 2005)

Com a crescente descoberta da existência de percloratos no ambiente, e a possibilidade de detectar e quantificar o perclorato por métodos analíticos, constata-se que a contaminação está hoje presente em praticamente todos os ambientes. No entanto, métodos analíticos, físicos e químicos apenas identificam e quantificam o tóxico, sem poder avaliar e detectar uma possível interacção entre outras substâncias que muitas vezes podem ser tóxicas para os organismos vivos, e sem determinar quais as quantidades nocivas nos diferentes compartimentos do ecossistema. Daí, a importância de se realizarem testes de toxicidade para saber o possível efeito que a substância possa ter sobre o sistema biológico.

Para além da componente ambiental, o perclorato surge como um stressor para a saúde humana. O perclorato foi detectado em leite comercializado, e também no leite

materno (Kirk et al., 2003; Kirk et al., 2005, respectivamente). O nitrato de sódio/salitre chileno foi utilizado por muito tempo na agricultura americana, contribuindo para a contaminação do solo e da água, nos EUA.

Na Califórnia e no Arizona foram encontradas concentrações de percloratos em vegetais frescos para comercialização e que estavam relacionados com contaminação da água de irrigação por percloratos. Neste caso, os horticultores utilizavam a água proveniente do Rio Colorado, o que levaria à contaminação dos vegetais, ocasionando uma preocupação no consumo de alimentos produzidos dentro da região (Sanchez et al., 2005). O perclorato também foi detectado em águas engarrafadas nos Estados Unidos da América (Snyder et al., 2005).

As plantas podem absorver e acumular perclorato proveniente do solo e da água de irrigação. Estudos mostram que nas plantas de tabaco crescidas em solos enriquecidos com fertilizantes que contenham nitrogénio derivado do salitre chileno, o perclorato permanece acumulado, tanto na planta, como no produto final (por exemplo cigarros, e charutos) mesmo após processos industriais. (Ellington et al., 2001). Níveis detectáveis de perclorato foram também observados em Las Vegas no cedro (*Tamarix ramosissima*) e em outros tipos de vegetação (Urbansky et al, 2000), na água, no solo e em roedores (Smith et al., 2004).

A contaminação também pode ser encontrada em várias espécies de algas (Martinelango et al., 2006), na carne de gado (Cheng et al., 2004) e em suplementos dietéticos e intensificadores de sabor (Snyder et al., 2006).

### **1.3 Modo de acção do perclorato**

Um dos mais importantes efeitos biológicos em humanos após exposição a perclorato em níveis provavelmente encontrados no ambiente é, a redução da captação de iodeto pela tiróide (Ting et al., 2006). No passado, o perclorato era usado como uma droga para tratar o hipertireoidismo. Em adultos, a tiróide é um importante regulador do metabolismo. Já nas crianças e fetos a hormona está relacionada com o crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central. As grávidas, fetos e recém-nascidos, apresentam maior risco de efeito adverso de deficiência de iodeto quando expostos a perclorato (USFDA, 2007).

Tabela 1. Toxicidade aguda de perclorato de amónia (PA) e perclorato de sódio (PS) em vários organismos aquáticos (adaptado de Liu, 2006). CL50- concentração que provoca mortalidade a 50% dos organismos expostos.

<b>Categoria</b>	<b>Nome-científico</b>	<b>Químico</b>	<b>Duração   Tipo de exposição</b>	<b>CL<sub>50</sub> (mg/L)</b>
Peixe	<i>Danio rerio</i>	PA	96h estático	529
Peixe	<i>Gambusia holbrooki</i>	PS	120h renovação estática	404
Peixe	<i>Lepomis macrochirus</i>	PS	96h por-fluxo	1470
Peixe	<i>Pimephales promelas</i>	PS	96h estático	1655
Peixe	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	PS	96h renovação estática	2010
Anfíbio	<i>Rana clamitans</i>	PS	96h por-fluxo	5100
Anfíbio	<i>Xenopus laevis</i>	PA	120h renovação estática	510
Invertebrado	<i>Lumbriculus variegatus</i>	PS	96h por-fluxo	3710
Invertebrado	<i>Corbicula fluminea</i>	PS	96h por-fluxo	6680
Invertebrado	<i>Chironomus tentans</i>	PS	96h por-fluxo	8140
Invertebrado	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	PS	48h estático	66
Invertebrado	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	PA	48h estático	77,8
Invertebrado	<i>Daphnia magna</i>	PS	48h estático	490
Invertebrado	<i>Hyalella azteca</i>	PS	96h estático	>1000

Nos invertebrados há pouca informação sobre os efeitos causados pelo perclorato (Smith, 2006), no entanto, na revisão bibliográfica efectuada por Liu, 2006, são apresentados os resultados de diversos estudos com diferentes espécies-teste (tabela

1), demonstrando que os percloratos apresentam um risco diminuto relativamente à sua toxicidade aguda para invertebrados e peixes.

#### 1.4 Objectivos do trabalho

Este trabalho tem como objectivo avaliar o efeito tóxico de perclorato de sódio, perclorato de amónio e da mistura binária destas substâncias químicas, em *Daphnia magna*. Para isso serão efectuados ensaios ecotoxicológicos agudos e crónicos, e avaliados os parâmetros imobilização, reprodução e inibição alimentar.

Para cumprir estes objectivos, esta tese será organizada do seguinte modo:

- **Introdução:** capítulo actual, onde se faz uma introdução à problemática da contaminação ambiental por percloratos e se delineiam os objectivos do trabalho.
- **Materiais e Métodos:** utilizados neste trabalho.
- **Resultados:** da exposição de perclorato de amónio e sódio, isolados e em mistura, em *Daphnia magna*.
- **Discussão:** dos resultados obtidos, com outros existentes na bibliografia.
- **Referências bibliográficas:** utilizadas em toda a dissertação.

---

## Materiais e Métodos





## **2. Matérias e Métodos**

### **2.1 Organismos-teste: *Daphnia magna***

O organismo-teste utilizado foi o microcrustáceo *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera), também conhecido como pulga de água, que é considerado um representante importante das comunidades bentônicas e zooplanctônicas de lagos (Ruppert et al., 2004).

Por se tratar de um organismo de fácil manipulação e manutenção em laboratório e com ciclo de vida rápido, é amplamente utilizado pela comunidade científica. É, por isso, considerado um instrumento de resposta rápida na avaliação da exposição a stressores existentes no ambiente aquático

### **2.2 Manutenção e cultivo de *D. magna***

Os organismos (clone K) foram mantidas em culturas controladas no Laboratório de Ecologia e Toxicologia Ambiental, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. As dáfrias foram mantidas a uma temperatura controlada de  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ , e fotoperíodo de 16 h:8 h (luz:escuro), em grupos de  $\pm 15$  indivíduos (apenas fêmeas) em recipientes com capacidade para 1000 ml com meio de cultura ASTM (ASTM, 1998). Estes indivíduos apresentam uma reprodução assexuada, por partenogénese, o que garante a continuidade e obtenção de organismos do mesmo clone, i.e. geneticamente idênticos.

O meio de cultura foi renovado a cada dois dias, procedendo-se a retirada dos neonatos. Diariamente foram alimentadas com *Pseudokirchneriella subcapitata* ( $5 \times 10^5$  cels/ml) e aditivo orgânico (Baird, 1989).

### **2.3 Metodologia utilizada nos testes ecotoxicológicos**

Os testes ecotoxicológicos agudos são utilizados para avaliar efeitos letais nos organismos-teste, ou seja, avaliar quais as concentrações de uma determinada substância que causam mortalidade nos organismos expostos, por um curto período de tempo.

Esses resultados são expressos em termos de valores de  $CL_{50}$  – concentração que provoca 50% de letalidade nos organismos expostos.

Os testes ecotóxicológicos crónicos avaliam efeitos sub-letais nos organismos, como o ciclo de vida completo dos organismos ou somente as fases mais sensíveis do desenvolvimento (ex. taxas de crescimento, reprodução, alimentação). Os resultados são expressos em valores de CENO – concentração utilizada mais elevada que não provoca efeito, CEO – concentração mais baixa utilizada que provocou um efeito observado e  $CE_{50}$  - concentração que provoca um efeito em 50% no parâmetro medido.

### 2.3.1 Princípio dos métodos utilizados

A metodologia empregada nos testes de imobilização e de reprodução para avaliar o efeito dos percloratos de sódio e de amónia, em *D. magna*, seguiu as recomendações da OECD para cada teste (OECD, 2004; OECD, 1998, respectivamente). O teste de inibição alimentar seguiu a metodologia descrita por McWilliam and Baird (2002).

Os testes com a mistura binária seguiram os mesmos protocolos, com ligeiras adaptações, nomeadamente no que refere ao número de réplicas utilizadas.

Os testes foram realizados conforme esquema da figura 1.

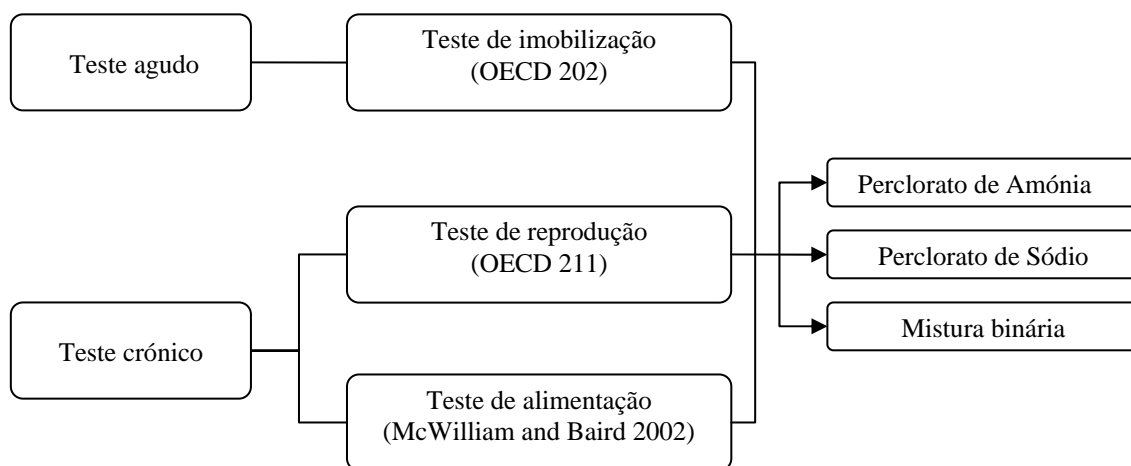


Figura 1. Fluxograma dos testes agudos e crónicos efectuados com *Daphnia magna* exposta a perclorato de amónia, perclorato de sódio e a mistura dos dois percloratos.

Como já referido anteriormente, as substâncias químicas utilizadas nestes trabalhos foram o perclorato de amónio ( $\text{NH}_4\text{ClO}_4$ ) (CAS N° 7790-98-9; Prolabo, VWR International) e perclorato de sódio ( $\text{NaClO}_4$ ) (CAS: 7601-89-0; 98% pureza; Sigma-Aldrich). As substâncias utilizadas são sais inorgânicos, que apresentam estado físico sólido na forma de cristais finos na cor branca e inodoro.

### **2.3.1.1 Teste de imobilização**

Os ensaios de imobilização foram realizados com base na metodologia descrita no protocolo padronizado OECD 202 (OECD, 2004), e onde neonatos (<24 horas de idade), foram expostos às substâncias-teste num período de 48 horas. A imobilização foi registada às 24 e 48 horas, e comparadas com o controlo.

O ensaio foi realizado em frascos de 50 ml de volume, cada um com cinco indivíduos, expostos a cinco concentrações, com cinco réplicas. O ensaio com as misturas foi realizado com apenas uma réplica, por cada uma das nove concentrações, com cinco indivíduos. O teste teve duração de 48 horas; foi mantido a uma temperatura de 20°C, sem adição de alimento, nem troca do meio de cultura. A contabilização do número de organismos imóveis foi feita após 24 e 48 horas de exposição, através de uma ligeira agitação dos frascos-teste e contabilização dos organismos com mobilidade. Após 48 horas procedeu-se ao cálculo do  $\text{CL}_{50}$ , utilizando o método de Probit (Minitab 13, 2000).

Nestes bioensaios as dáfrias foram expostas a:

- Perclorato de amónia ( $\text{NH}_4\text{ClO}_4$  ;250, 350, 450, 550 e 650mg/L);
- Perclorato de sódio ( $\text{NaClO}_4$  , 1000, 2000, 3000 e 4000mg/L),
- Mistura de  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$  +  $\text{NaClO}_4$  (ver Tabela 2).

As concentrações escolhidas para os ensaios de exposição simples tiveram em conta ensaios preliminares (dados não apresentados), enquanto as concentrações utilizadas no ensaio com a mistura binária foram baseadas nos resultados dos testes de exposição simples, apresentando um desenho experimental factorial completo.

Tabela 2. Concentrações nominais de perclorato de amônio e perclorato de sódio em mistura utilizada no teste de imobilização com *Daphnia magna*.

<b>NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub></b> (mg/l)	<b>NaClO<sub>4</sub></b> (mg/l)
150	2000
450	2000
600	2000
150	4000
450	4000
600	4000
150	6000
450	6000
600	6000

### 2.3.1.2 Teste de reprodução

Os ensaios de reprodução foram realizados com base na metodologia descrita no protocolo padronizado OECD 211 (OECD, 1998). No teste de reprodução, neonatos de *D. magna* (<24h de idade) foram expostos aos compostos químicos durante 21 dias, avaliando-se o número de neonatos obtidos por fêmea, assim como o crescimento da fêmea durante este período de exposição. No primeiro dia do ensaio foram medidas algumas dáfnias pertencentes à mesma ninhada da utilizada no teste, para se obter um valor médio inicial do seu comprimento, utilizando um microscópio óptico, com régua de escala. Os valores foram obtidos considerando a distância da cabeça até o final da carapaça, não considerando as antenas e o espinho, conforme esquematizado na figura 2. Foram também medidos parâmetros físico-químicos como o pH, condutividade e oxigénio dissolvido na água. A renovação do meio foi efectuada a cada dois dias. Diariamente, o número de neonatos foi contabilizado.

A exposição de 21 dias foi realizada a uma temperatura de 20°C, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. Com cada uma das substâncias foram utilizadas 10 réplicas por tratamento, cada uma com apenas um indivíduo; as dáfnias foram alimentadas diariamente com *Pseudokirchneriella subcapitata* ( $5 \times 10^5$  cels/ml), complementado com um aditivo orgânico (extracto de alga), como descrito para a manutenção das culturas. No ensaio com misturas seguiu-se o mesmo procedimento realizado com cada uma das substâncias, mas apenas foram utilizadas três réplicas.

No final dos 21 dias de exposição, foi feita a medição do comprimento das dáfrias, utilizando a mesma metodologia já descrita.

Nestes bioensaios as dáfrias foram expostas a:

- Perclorato de amónio ( $\text{NH}_4\text{ClO}_4$ ; 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200mg/L);
- Perclorato de sódio ( $\text{NaClO}_4$ ; 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 130mg/L);
- Mistura de  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$  +  $\text{NaClO}_4$  (ver Tabela 3).

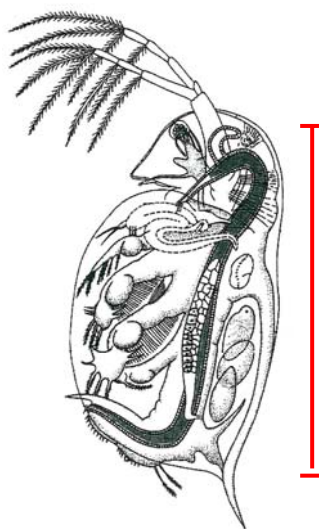


Figura 2. Representação gráfica de *Daphnia magna* indicando o segmento medido para determinação do comprimento dos indivíduos (imagem adaptada de Ruppert, et al., 2004).

As concentrações escolhidas para os ensaios de exposição simples tiveram em conta ensaios preliminares (dados não apresentados), enquanto as concentrações utilizadas no ensaio com a mistura binária foram baseadas nos resultados dos testes de exposição simples, apresentando um desenho experimental factorial completo.

Tabela 3. Concentrações nominais de perclorato de amônio e perclorato de sódio em mistura utilizada no teste de reprodução com *Daphnia magna*.

<b>NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub></b> (mg/l)	<b>NaClO<sub>4</sub></b> (mg/l)
100,00	130,00
87,50	16,25
75,00	32,50
75,00	97,50
62,50	48,75
62,50	16,25
50,00	65,00
50,00	32,50
37,50	81,25
37,50	48,75
37,50	16,25
25,00	97,50
25,00	65,00
25,00	32,50
25,00	16,25
12,50	113,75
12,50	81,25
12,50	48,75
12,50	32,50
12,50	16,25

### 2.3.1.3 Teste de Alimentação

Os ensaios de alimentação foram realizados com base na metodologia descrita por McWilliam and Baird (2002). Para este teste foram utilizadas dáfias (de 3º a 5º ninhada) previamente separadas da cultura inicial e mantidas nas mesmas condições, após terem efectuado a 3ª muda ( $\pm 4$  dias de idade).

Este bioensaio apresenta duas fases distintas:

1ª fase- exposição- os organismos-teste foram expostos ao(s) stressor(s), durante 24 horas, com alimento (*P. subcapitata*,  $5 \times 10^5$  cels/ml);

2ª fase- pós exposição- durante 4 horas, os organismos-teste foram acondicionados, na presença de alimento (*P. subcapitata*,  $5 \times 10^5$  cels/ml) e ausência de stressor.

As duas fases do ensaio decorreram na ausência de luminosidade e a uma temperatura de 20°C.

Em ambas as fases foi mantido uma réplica semelhante a cada tratamento mas com a ausência de dáfrias, para controlar o crescimento das algas.

Para determinar as taxas de alimentação em cada período, a concentração de algas foi medida através de um método espectrofotométrico, sendo as soluções de exposição lidas num espectrofotómetro (Jenway, 6505 uv/vis), a uma absorvância de 440nm, e a sua concentração determinada pela equação 1.

$$C = -17107.5 + ABS \times 7925350 \quad (\text{equação 1})$$

onde:

C é a concentração das algas(cells/ml)

ABS é a absorvância obtida a 440 nm.

O cálculo da taxa de alimentação foi efectuado utilizando a equação 2.

$$T_a = V \times (C_i - C_f) / (t \times n) \quad (\text{equação 2})$$

onde:

**T<sub>a</sub>- Taxa de alimentação ( cels/ind.hr)**

C<sub>i</sub> - concentração inicial (cells/ml)

C<sub>f</sub> - concentração final (cells/ml)

V- volume da solução teste (ml)

t- duração do experimento (h)

n- número de indivíduos expostos

Na 1ª fase de exposição, as dáfrias foram expostas a:

- Perclorato de amónio (NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub>; 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 e 600 mg/L).
- Perclorato de sódio (NaClO<sub>4</sub>; 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 e 2000mg/L)
- Mistura de NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub> + NaClO<sub>4</sub> (ver Tabela 4).

As concentrações escolhidas para os ensaios de exposição simples tiveram em conta ensaios preliminares (dados não apresentados), enquanto as concentrações utilizadas no ensaio com a mistura binária foram baseadas nos resultados dos testes de exposição simples, apresentando um desenho experimental factorial completo.

Tabela 4. Concentrações nominais de perclorato de amónio e perclorato de sódio em mistura utilizada no teste de alimentação com *Daphnia magna*.

<b>NH<sub>4</sub>ClO<sub>4</sub></b> (mg/l)	<b>NaClO<sub>4</sub></b> (mg/l)
150,00	1000,00
131,25	125,00
112,50	250,00
112,50	750,00
93,75	375,00
93,75	125,00
75,00	500,00
75,00	250,00
56,25	625,00
56,25	375,00
56,25	125,00
37,50	750,00
37,50	500,00
37,50	250,00
37,50	125,00
18,75	875,00
18,75	625,00
18,75	375,00
18,75	250,00
18,75	125,00

### 2.3.2 Teste de sensibilidade

Antes de iniciar a bateria de testes já descrita, as dáfias da cultura de laboratório foram submetidas a um teste de sensibilidade para verificar a sua viabilidade/sensibilidade. Foi utilizado o composto químico dicromato de potássio



(K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), como substância tóxica de referência para determinar a sensibilidade dos organismos através de um teste de imobilização de 24h e do cálculo do valor de CL<sub>50</sub>, de acordo com o protocolo OCDE 202 (2004). Para isso foi utilizada uma gama de 5 concentrações, com 5 réplicas de 5 indivíduos cada. O valor de CL<sub>50</sub> para 24h estava dentro da gama de valores sugerida pelo protocolo da OCDE (0,6–1,7 mg/L) (OECD, 1998).

## **2.4 Análise estatística**

### **2.4.1 Estatística dos testes de exposição isolada**

A imobilização das dáfnias foi observada após 48 horas e procedeu-se ao cálculo do CL<sub>50</sub>, utilizando o método de Probit (Minitab 13, 2000).

Nos dados dos testes de reprodução e alimentação foi utilizada uma ANOVA de uma via (Sigma Stat, SPSS, 1995) e sempre que foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, foi utilizado o método de comparação múltipla de Dunnett (Zar, 1996), sendo calculados valores de CEO (concentração de efeito observado) e CENO (concentração de efeito não observado).

### **2.4.2 Estatística dos testes de exposição em mistura**

Para avaliar o efeito tóxico das misturas de percloratos, os efeitos observados foram comparados com os efeitos esperados, através dos resultados obtidos nos dados de exposição isolada. Este procedimento baseou-se no modelo conceptual de Adição de Concentração, que é descrito pela equação:

$$\sum_{i=1}^n C_i / CE_{xi} = 1 \quad \text{equação 3}$$

onde:

C<sub>i</sub>- concentração do stressor i

CE<sub>xi</sub> – concentração do stressor i que induz o mesmo efeito (x%) que a mistura como um todo

Este modelo foi escolhido pois os dois compostos químicos apresentam modos de acção iguais. No caso do teste de imobilização o CExi foi substituído pelo CL<sub>50</sub> e no caso dos testes de reprodução e inibição alimentar pelo valor de CEO.

Tabela 5- Interpretação dos parâmetros adicionados ao modelo conceptual de adição de concentração (*a* e *b*) que definem o padrão e a forma de desvio do modelo conceptual (adaptado de Jonker et al., 2005).

Padrão de desvio	Parâmetro <i>a</i>	Parâmetro <i>b</i>
<b>sinergismo   antagonismo (S   A)</b>	<b>a&gt;0:</b> antagonismo	-
	<b>a&lt;0:</b> sinergismo	-
<b>dependente do rácio dos químicos</b>	<b>a&gt;0:</b> antagonismo, excepto para as misturas onde o valor de $b<0$ indique um sinergismo significativo	<b><math>b_i&gt;0</math>:</b> antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada maioritariamente pelo químico i
	<b>a&lt;0:</b> sinergismo, excepto para as misturas onde o valor de $b>0$ indique um antagonismo significativo	<b><math>b_i&lt;0</math>:</b> sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada maioritariamente pelo químico i
<b>Dependente da concentração utilizada</b>	<b>a&gt;0:</b> antagonismo a concentrações baixas e sinergismo a concentrações elevadas	<b><math>b&gt;1</math>:</b> alteração do padrão de resposta a níveis inferiores ao CE50
	<b>a&lt;0:</b> sinergismo a concentrações baixas e antagonismo a concentrações elevadas	<b><math>b=1</math>:</b> alteração do padrão ao nível do CE50
		<b><math>0&lt;b&lt;1</math>:</b> alteração do padrão de resposta a níveis superiores ao CE50
		<b><math>b&lt;1</math>:</b> Sem alteração de padrão, mas a magnitude de S A é dependente da concentração

Neste caso foram também avaliados desvios a estes modelos, como sejam desvios para sinergismo, antagonismo ou desvios dependentes da concentração utilizada. Para isso utilizaram-se parâmetros adicionados ao modelo matemático de adição de concentração e foram testados de um modo hierárquico. Os modelos foram ajustados aos dados através de um método da máxima verosimilhança (maximizando a

probabilidade de obter o grupo observado de dados), minimizando a função objectiva (L ou soma dos quadrados) e estatisticamente comparados. O melhor ajuste dos dados foi obtido através de um teste de  $\text{Chi}^2$  baseado na minimização da função objectiva da verosimilhança binomial logarítmica.

A interpretação biológica dos parâmetros adicionais obtidos que identificam o desvio, estão sumarizados na Tabela 5 (para mais detalhes ver Jonker et al., 2005).



---

## Resultados



### 3. Resultados

#### 3.1 Teste agudo – teste de imobilização

Os resultados da exposição de *D. magna* aos compostos químicos isolados, apresentados na Tabela 6, foram obtidos pelo método de Probit (Minitab 13, 2000). O valor de CL<sub>50</sub> obtido para perclorato de amónia foi bastante inferior ao do perclorato de sódio, indicando que é aproximadamente 10 vezes mais tóxico no período de exposição de 48 horas.

Tabela 6. Valores de CL<sub>50</sub> (24 e 48 horas) obtidos no teste de imobilização de *Daphnia magna* expostas a perclorato de amónio e perclorato de sódio. O valor do erro padrão encontra-se entre parêntesis)

Químico (mg/L)	CL <sub>50</sub> 24 horas	CL <sub>50</sub> 48 horas
NH <sub>4</sub> ClO <sub>4</sub>	652,06 (26,66)	396,21 (11,80)
NaClO <sub>4</sub>	4914 (643,12)	3925 (299)

No bioensaio com mistura obteve-se um desvio ao modelo de adição da concentração, com uma resposta dependente do rácio dos químicos utilizados. Neste caso, obteve-se um padrão sinérgico quando o perclorato de sódio era o químico dominante e uma resposta tipicamente antagonista ( $a=-4,37$ ;  $b=9,09$ ;  $P<0,05$ ,  $SS=11,55$ ;  $r^2=0,742$ ), provocada pela presença dominante de perclorato de amónia (Fig. 3).

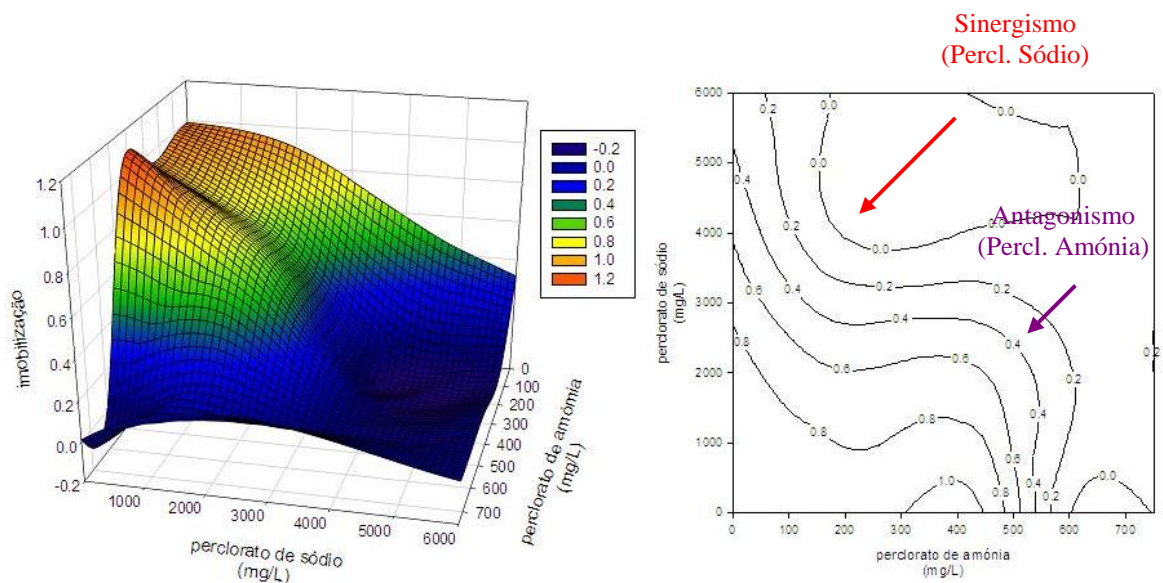


Figura 3. Curvas de dose-resposta para a sobrevivência de *Daphnia magna* exposta isoladamente e em mistura a perclorato de amónia e de sódio. O gráfico da esquerda apresenta uma simulação em 3D, e o da direita em 2D.

### 3.2 Teste crónico – teste de reprodução

Os valores de CEO (concentração de efeito observado) foram calculados a partir dos resultados dos bioensaio de toxicidade crónica realizados com cada um dos diferentes compostos químicos.

O efeito do perclorato de amónio na reprodução das dáfrias, com relação à quantidade de neonatos, ocorreu a partir da concentração de 100mg/L, apresentando um decréscimo significativo no número de neonatos, com o aumento das concentrações (Fig. 4). A diferença no tamanho das dáfrias, após o período de duração do teste (21 dias), foi também observada na exposição a perclorato de amónia a partir de 120mg/L.



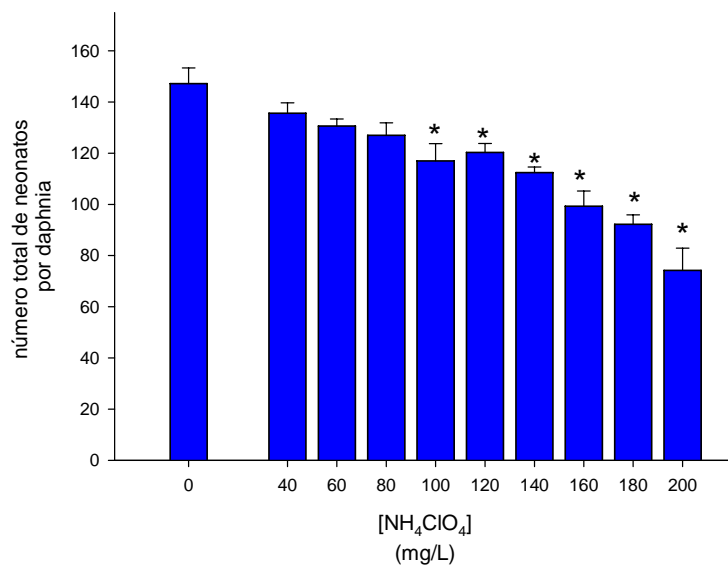


Figura. 4- Reprodução de *Daphnia magna* (número total de neonatos) após a exposição a perclorato de amônia durante 21 dias.\*  $P < 0.05$ , Método de Dunnett's, comparado com o controle (0 mg/L).

Na figura 5, são apresentados exemplares de dáfias expostas às concentrações: controle (0mg/L, dáfia da esquerda), intermediária (100mg/L, dáfia do meio) e na maior concentração de  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$  (200 mg/L, dáfia da direita), evidenciando o efeito do composto químico sobre o desenvolvimento dos organismos-teste.



Figura 5- Dáfias expostas a  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$  durante 21 dias: a dáfia da esquerda foi exposta ao meio de controle, a dáfia do centro à concentração de 100mg/L e a dáfia da direita exposta a 200mg/L.

Os resultados obtidos na exposição de *D. magna* a perclorato de sódio indicam diferenças no tamanho das dáfrias a partir da concentração de 70mg/L, mas não a ponto de serem visualmente registadas. Quanto ao número de dáfrias nascidas, verificou-se uma diferença significativa apenas na concentração mais elevada utilizada (130 mg/L) (Fig. 6).

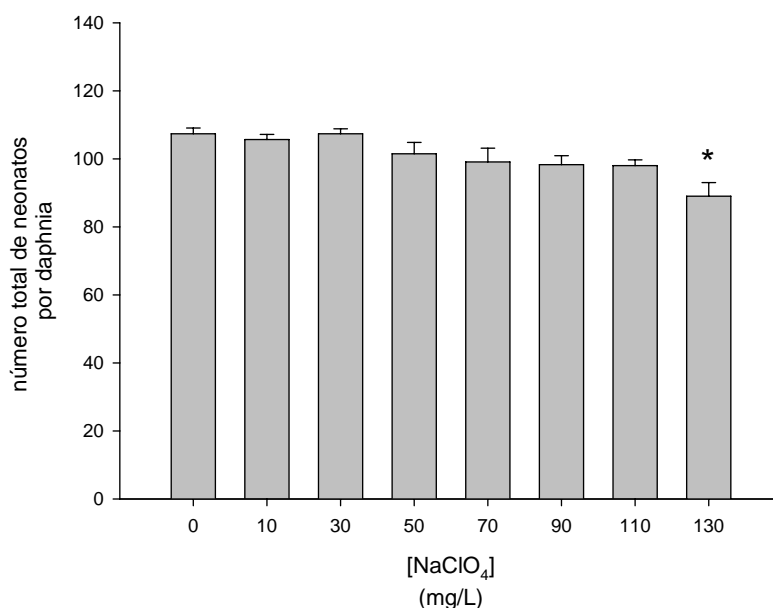


Figura 6- Reprodução de *Daphnia magna* (número total de neonatos) após a exposição a perclorato de sódio durante 21 dias.\*  $P < 0.05$ , Método de Dunnett's, comparado com o controlo (0 mg/L).

O efeito da mistura binária na reprodução resultou num comportamento de adição da concentração, onde o efeito final dos dois compostos químicos ( $\text{NH}_4\text{ClO}_4 + \text{NaClO}_4$ ) foi igual à soma dos efeitos produzidos isoladamente ( $\text{SS}=36244$ ;  $P < 0,05$ ;  $r^2=0,225$ ) (Fig. 7).

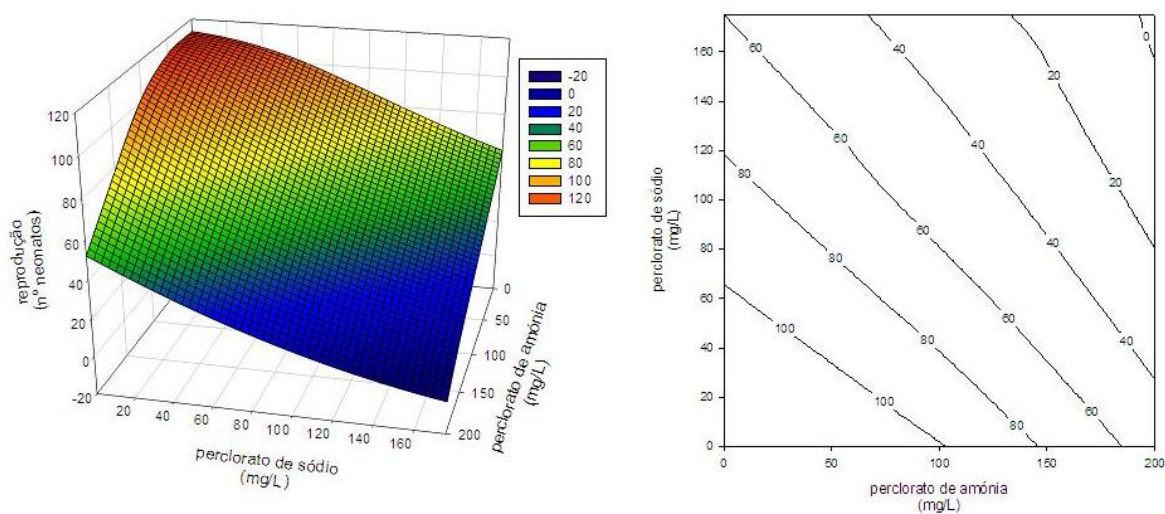


Figura 7- Curvas de dose-resposta para a reprodução (nº de neonatos) de *Daphnia magna* exposta isoladamente e em mistura a perclorato de amônia e de sódio. O gráfico da esquerda apresenta uma simulação em 3D, e o da direita em 2D.

### 3.3 Teste crónico – teste de alimentação

No teste de inibição alimentar, após a exposição de 24 horas a perclorato de amônia, foi observada uma inibição alimentar a partir da concentração de 150 mg/L (Figura 8). Após o período de pós-exposição de 4 horas, em meio limpo, ainda foi possível observar efeito do perclorato de amônio a uma concentração de 550 mg/L.

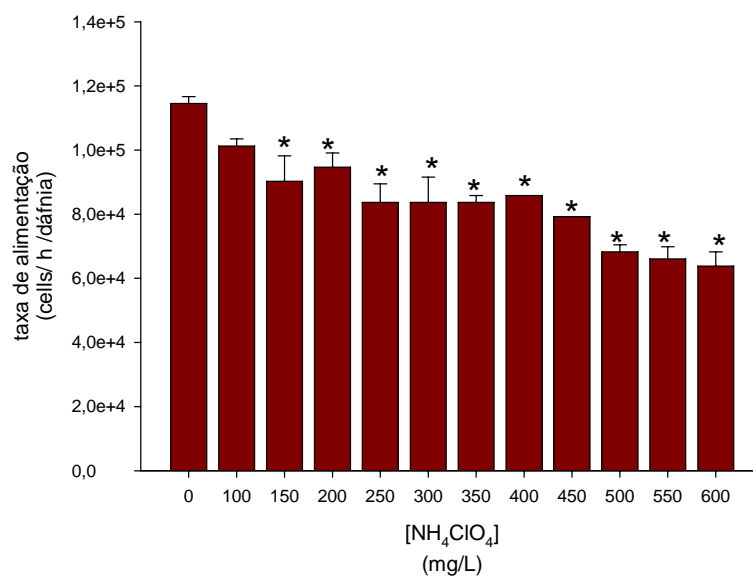


Figura 8. Taxa de alimentação de *Daphnia magna* exposta durante 24h a perclorato de amónio. (\*-  $P < 0.05$ , teste Dunnett)

Para o perclorato de sódio, o efeito sobre a taxa de alimentação foi observado nas concentrações mais elevadas de 1000 e 2000 mg/L. O valor de CEO para pós-exposição foi de 2000 mg/L. Cabe salientar que houve a ocorrência de um factor atípico desconhecido, evidenciando inibição alimentar aquando a exposição a 300 mg/L.

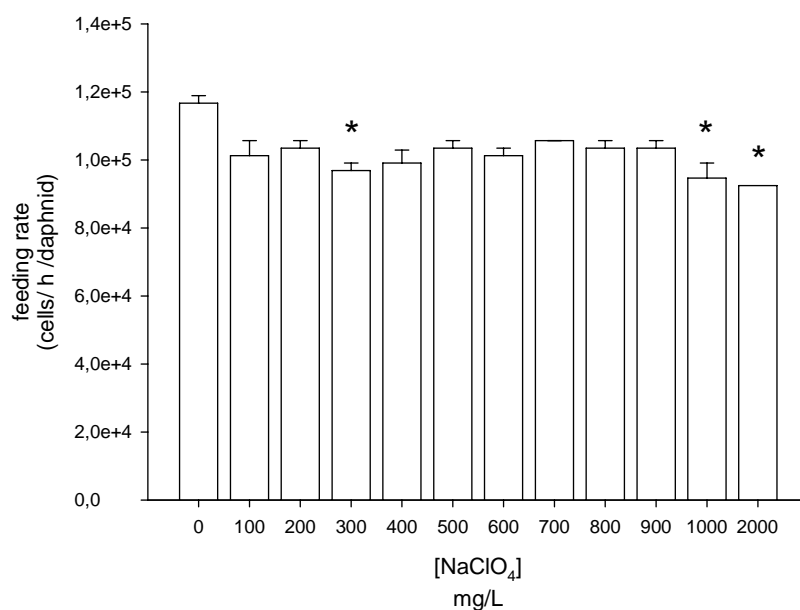


Figura 9. Taxa de alimentação de *Daphnia magna* exposta durante 24h a perclorato de sódio. (\*-  $P < 0,05$ , teste Dunnett).

No bioensaio com mistura obteve-se um desvio ao modelo de adição da concentração, com uma resposta dependente das concentrações utilizadas dos químicos. Neste caso, obteve-se um padrão antagonista quando as concentrações de ambos os químicos foram baixas, passando a sinergismo antes da taxa de alimentação baixar 50% relativamente ao controlo amónia ( $a=90,98$ ;  $b=1,15$ ;  $P < 0,05$ ;  $SS=6,77 \times 10^8$ ;  $r^2=0,722$ )(Fig. 10).

Quando os dois tóxicos estavam em concentrações mais baixas quase não houve efeito na taxa de alimentação; no entanto, ocorreu um efeito antagónico na combinação das doses entre 500 a 1000mg/L de perclorato de sódio, com as doses aproximadas de 20 a 100 mg/L de perclorato de amónia.

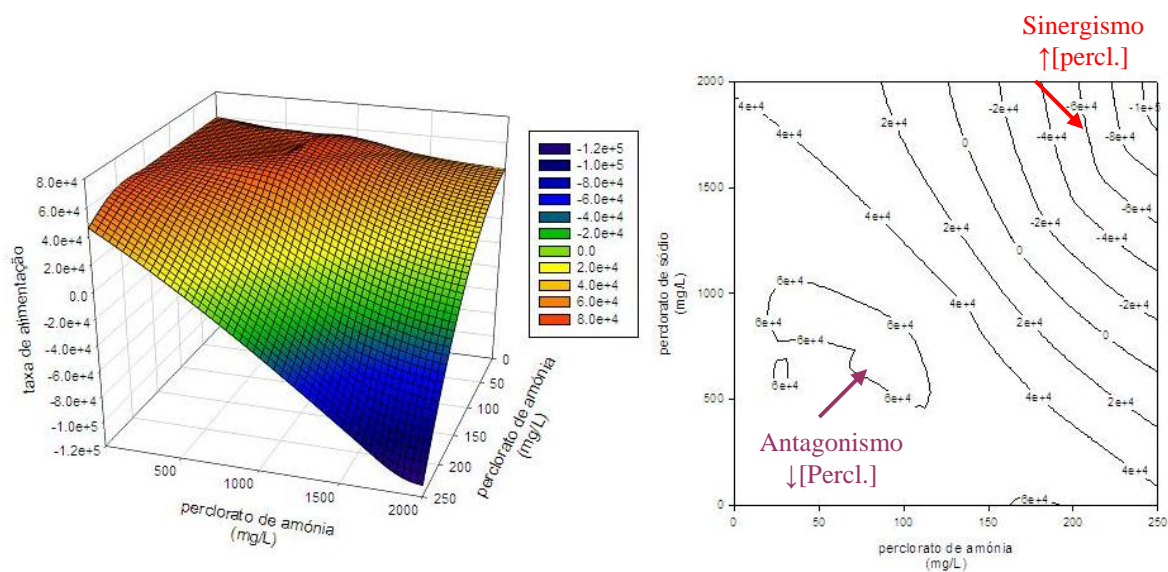


Figura 10. Curvas de dose-resposta para a taxa de alimentação de *Daphnia magna* exposta isoladamente e em mistura a perclorato de amônia e de sódio. O gráfico da esquerda apresenta uma simulação em 3D, e o da direita em 2D.

---

Discussão





#### 4. Discussão

Os testes de imobilização demonstraram inicialmente as diferentes toxicidades dos dois percloratos. O perclorato de amónio apresentou um  $CL_{50}$  de 396,21 mg/L, enquanto o perclorato de sódio um valor 10 vezes superior (3925mg/L).

Nos testes crónicos de reprodução (exposição de longa duração), a toxicidade dos dois compostos demonstrou ser semelhante.

No ensaio alimentar, observou-se uma menor toxicidade do perclorato de sódio, quando comparado com o perclorato de amónio. Este padrão foi idêntico ao observado no teste agudo, sugerindo que consoante os tempos de exposição (curtos ou longos) poderemos obter diferentes padrões de toxicidade e efeitos colaterais possivelmente provocados pelos iões que formam o perclorato (neste caso sódio e amónia).

Após a exposição de 4 horas a exposição a perclorato de amónio manteve o seu efeito mesmo quando as dáfnias foram transferidas para um meio limpo (sem tóxico), enquanto no caso do perclorato de sódio não foi demonstrado qualquer efeito da sua pré-exposição.

Nos testes realizados com misturas, foram possíveis observar três comportamentos distintos em três diferentes parâmetros, demonstrando que diferentes parâmetros podem originar diferentes resultados, pois tudo depende do modo de acção dos compostos químicos. O modelo conceptual CA (adição da concentração) só foi válido para um dos parâmetros (nº de neonatos), tendo nos outros dois apresentado um desvio dependente do químico ou das doses utilizadas.

Como para outros compostos químicos, há diferenças na toxicidade quando diferentes iões são associados com o perclorato. Este também foi o caso do estudo apresentado por Lock e Janssen (2003), onde avaliaram a toxicidade de zinco em forma de sal, pó e óxido de zinco para os oligoquetas *Eisenia fetida*, e *Enchytraeus albidus*, e para o colêmbolo *Folsomia cândida*. Neste estudo a toxicidade aguda de cloreto de zinco era menor do que a das outras formas. Mas quando esta toxicidade era expressa em termos de água intersticial a toxicidade aguda era maior neste sal. Este facto realça a diferença, em termos de biodisponibilidade, nas diferentes formas de zinco. Em termos de exposição de longa duração, a toxicidade foi semelhante para as três formas do elemento metálico.

Quando comparamos a toxicidade de vários percloratos para várias espécies, verificamos também uma diferença nas suas sensibilidades. O mosquito *Chironomus tentans* é uma das espécies mais tolerantes para a exposição ao perclorato de sódio com uma CL<sub>50</sub> de até 8100 mg/L. Em contraste, a CL<sub>50</sub> para *Ceriodaphnia dubia* (adultos) foi baixa (66 mg/L) (Liu, 2006). Segundo o relatório da EA Engineering Science and Technology de 1998, o valor da CL<sub>50</sub> para a espécie de *Daphnia magna* para perclorato de sódio é de 490 mg/L. Um valor muito baixo quando comparado com o encontrado neste teste de imobilização em que a CL<sub>50</sub> foi de 3925 mg/L (tabela 5). Já o resultado obtido com *Pimephales promelas* num ensaio de 96h o CL<sub>50</sub> foi de 1655mg/L.

Liu (2006) descreve vários exemplos de estudos onde utilizaram o perclorato de sódio e expuseram o ião de sódio como controlo positivo para avaliar a contribuição de sódio à toxicidade. O valor encontrado foi de 10,000mg/L e não teve efeito tóxico. No caso do perclorato de amónia, é conhecida a elevada toxicidade da amónia (por si só) para os organismos aquáticos, o que pode levar, então, a uma diferença de toxicidades quando comparamos os dois percloratos.

Num estudo realizado com *Danio rerio*, Mukhi and Patiño (2007) concluíram que na exposição ao perclorato não houve efeito na fertilização dos ovos nem na taxa de eclosão. No entanto, medindo o diâmetro dos ovos fertilizados e o comprimento das larvas verificou-se que houve um aumento após a exposição materna ao perclorato. Quando expostos durante 10 semanas foi observada uma hipertrofia tiroideal e redução coloidal. Em organismos adultos a exposição prolongado ao perclorato ocasionou rompimento no sistema endócrino da tiróide, assim como prejudicou a reprodução.

Para *Gambusia holbrooki*, adultos e alevinos, expostos ao perclorato de sódio foi obtido um valor de CL<sub>50</sub> de 404mg/L (Park et al, 2006). Na avaliação do esforço reprodutivo foi demonstrado que não houve redução da fecundidade na dose associada àquela que provocou efeitos ao nível da tiróide. As taxas de sobrevivência dos alevinos foram afectadas pelos níveis elevados de perclorato de sódio. Quando avaliaram o seu crescimento, foi observado um aumento aquando da exposição a 1mg/L e inibição a 10mg/L (Park et al, 2006).

Dean et al (2004) realizaram estudos onde avaliaram o efeito do perclorato de sódio em vários organismos aquáticos. O CE50 em 96h para *Oncorhynchus mykiss* e o *Lepomis macrochirus* foi de 2010mg/L e 1470mg/L respectivamente, podendo-se considerar na mesma gama dos valores encontrados no nosso estudo.

Estudos realizados por Goleman et al, (2001) determinaram as concentrações de perclorato de amónia em que há inibição do desenvolvimento e da metamorfose na espécie de *Xenopus laevis* com idades de 5 e 70 dias. Os resultados mostraram que o perclorato de amónia não causa anomalias no desenvolvimento relacionadas com a concentração, para concentrações abaixo da CL<sub>50</sub> e para períodos de 70 dias. Para além desse facto, houve inibição da metamorfose com um padrão de dose-resposta com efeitos evidentes na emergência dos membros dianteiros, reabsorção da cauda e crescimento dos membros traseiros.

Existem alguns trabalhos com misturas de compostos químicos, onde o perclorato era parte da mistura. Esse é o caso do trabalho com a exposição de larvas de *Danio rerio* a perclorato de sódio e arsenato de sódio (Liu et al, 2005; Liu, 2006), que indicou que a combinação destes compostos originava efeitos que poderiam ser modelados pelo modelo conceptual de adição da concentração, no caso do parâmetro sobrevivência.

Como mencionado por vários autores, os padrões de resposta de misturas compostas são específicos quer da espécie em causa, quer do parâmetro escolhido (Cedergreen and Streibig, 2005; Gomez-Eyles et al., 2009; Loureiro et al., in press). No nosso estudo, vários padrões de resposta foram obtidos após a modelação matemática nos diferentes parâmetros e tempos de exposição. O perclorato de sódio demonstrou ser o químico dominante no aumento da toxicidade para exposições de curta duração (testes de imobilização e de alimentação). No teste de reprodução, o modelo conceptual adição da concentração foi o que obteve um melhor ajuste dos nossos dados.



---

## Referências bibliográficas



## Referências

ASTM, 1998. Standard practice for conducting toxicity tests with fishes, microinvertebrates and amphibians. E 729-90., Annual Book of ASTM Standards. ASTM (American Society for Testing Materials), Philadelphia, PA, 271-296.

Adams, W.J., Rowland, C.D., 2003. Aquatic toxicology test methods in: Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A. J. Handbook Ecotoxicology. Boca Raton. 2n ed.

Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., Girling, A., Barber, I., Bradley, M.C., Calow, P., 1989. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In: Lokke, H., Tyle, H., Bro-Rasmussen, F. (Eds.), Proceedings of the First European Conference on Ecotoxicology. Lyngby, Denmark, pp. 144–148.

Bausinger, T., Bonnaire, E., PreuB. J., 2007. Exposure assessment of a burning ground for chemical ammunition on the Great War battlefields of Verdun. Science of the Total Environment. 382, 259-271.

Cedergreen, N., Streibig, J., 2005 Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? Environm. Toxicol. and Chem. 24: 1676-1683.

Cheng, Q., Perlmutter, L., Smith, P.N., McMurry, S.T., Jackson, W. A., Anderson, T.A., 2004. A study on perchlorate exposure and absorption in beef cattle. J. Agric. Food Chem. 52, 3456-3461.

Damásio, J., Tauler, R., Teixido, E., Rieradevall, M., Prat, N., Riva, M. C., Soares A. M. V. M., Barata, C., 2008. Combined use of *Daphnia magna* in situ bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). Aquatic Toxicology 87(4): 310-320.

Dasgupta, P.K., Martinelango, P.K., Jackson, W.A., Anderson, T.A., Tian, K., Tock, R.W., Rajagopalan, S., 2005. The Origin of Naturally Occurring Perchlorate: "The Role of Atmospheric Processes." Environ. Sci. Technol. 39(6): 1569-1575.

Dean, K.E., Palachek, R.M., Noel, J.M., Warbritton, R., Aufderheide, J., Wiremans, J. 2004. Development of freshwater water-quality criteria for perchlorate. Environ. Toxicol. Chem. 23(6), 1441-1451

Demnerova, K., Lovecka, P., Mateju, L., Mackova, M., Filip, A.Z., 2007. Approaches in environmental ecotoxicology. Simeonova, P.P. et al. Nanotechnology – Toxicological Issues and Environmental Safety, Springer. 249–270.

DOD Perchlorate handbook. Revision 1. May 2007. Department of defense environmental. United States

EA Engineering, Science, and Technology., 1998. Results of acute and chronic toxicity testing with sodium perchlorate. Report 2900. Brooks AFB, TX, USA. 1-156.

Ellington, J.J., Wolfe, N.L., Garrison, W., Evans, J.J., Avants, J.K., Teng, Q., 2001. Determination of perchlorate in tobacco plants and tobacco products. Environ. Sci. Technol. 35, 3213-3218.

Foth, H. (1999) Ecotoxicology. In Toxicology. Marquardt, H., Schäfer, S., McClellan, R. O. and Welsch, F. (Eds). Elsevier, pp 1067-1085.

Goleman, W.L., Urquidi, L.J., Anderson, T.A., Smith, E.E., Kendall, R.J., Carr, J.A., 2002. Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit development and metamorphosis in *Xenopus laevis*. Environ. Toxicol. Chem. 21(2), 424-430.

Gomez-Eyles, J. L., Svendsen, C., Lister L, Martin, H., Hodson, M. E., Spurgeon, D. J., 2009. Measuring and modelling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 71-79.



Harte, J., 2007. Human population as a dynamic factor in environmental degradation. *Popul. Enviro.* 28, 223-236.

ITRC Interstate Technology Regulatory Council. 2005. Perchlorate: overview of issues, states, and remediation options. September. 1-152. Perchlorate team.

Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose-level dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701–2713.

Kirk, A.B., Martielango, P.K., Tian, K., Dutta, A., Smith, E., Dasgupta, P. K., 2005. Perchlorate and iodide in Dairy and Breast Milk. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2011-2017.

Kirk, A.B., Smith, E.E., Tian, K., Anderson, T.A., Dasgupta, P.K., 2003. Perchlorate in milk. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4979-4981.

Lock, K., Janssen, C.R., 2003. Comparative toxicity of a zinc salt, zinc powder and zinc oxide to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere* 53, 851–856.

Liu, F., 2006. Evaluation on combinative toxicology of sodium perchlorate and sodium arsenate using zebrafish *Danio rerio* as a model. A dissertation in environmental toxicology. Submitted to the Graduate Faculty of Texas Tech University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of doctor of philosophy. Maio.

Loureiro, S., Ferreira, A.L.G, Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., 2005. Evaluation of the Toxicity of Two Soils from Jales mine (Portugal) Using Aquatic Bioassays. *Chemosphere.* 61, 168-177.

Loureiro, S., Amorim, M.J.B., Campos, B., Rodrigues, S.M.G., Soares, A.M.V.M., in press. Assessing joint toxicity of chemicals in *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae) and

Porcellionides pruinosus (Isopoda) using avoidance behaviour as an endpoint. Environmental Pollution.

Martinelango, P.K., Tian, K., Dasgupta, P.K., 2006. Perchlorate in seawater bioconcentration of iodide and perchlorate by various seaweed species. Anal. Chim. Acta. 567, 100-107.

McWilliam, R.A., Baird, D.J., 2002. Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 21(6), 1198-1205.

Minitab, I., 2000. Minitab Statistical Software 13.0.

Mukhi, S., Patiño, R., 2007. Effects of prolonged exposure to perchlorate on thyroid and reproductive function in Zebrafish. Toxicol. Scien. 96, 264-254.

Nikunen, E., Miettinen, V., 1985. *Daphnia magna* as an indicator of acute toxicity of waste waters. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 35, 368-374.

OECD 202, 2004. Organization For Economic Co-Operation And Development. Revised Proposal for updating Guidelines 202. *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. Revised Draft Document. April, 1-12.

OECD 211, 1998. Organization For Economic Co-Operation And Development. Draft Guideline, 1997. *Daphnia magna* Reproduction test. September, 1-21.

Park, J.W., Rinhard, J., Liu, F., Anderson, T.A., Kendall, R.J., Theodorakis, C.W., 2006. The thyroid andocrine disruptor perchlorate affects reproduction, growth, and survival of mosquitofish. Ecotoxicol. Environ. Saf. 63, 343-352.

Ruppert E.E., Fox R.S, Barnes R.D. 2004. Invertebrate Zoology – A functional Evolutionary Approach. 7<sup>th</sup> ed. Brooks Cole Thomson, Belmont CA. 963pp.

Sanchez, C.A., Krieger, R.I., Khandaker, N., Moore, R.C., Holts, K.C., Neidel, L.L., 2005. Accumulation and perchlorate exposure potential of lettuce produced in the lower Colorado River Region. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5479-5486.

SPSS, 1995. *SigamStat for Windows* (version 2.03), IL.

Smith, P. N., Yu, L., McMurry, S. T., Anderson, T. A., 2004. Perchlorate in water, soil, vegetation, and rodents collected from the Las Vegas Wash, Nevada, USA. *Environ. Pollut.* 132, 121-127.

Smith, P.N., 2006. The ecotoxicology of perchlorate in the environment in: Gu, B., Coates, J.D., *Perchlorate environmental occurrence, interactions and treatment.* 153-168.

Snyder, S.A., Vanderford, B.J., Rexing, D.J., 2005. Trace analysis of bromate, chlorate, iodate and perchlorate in natural and bottled waters. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4586-4593.

Snyder, S.A., Pleus, R.C., Vanderford, B.J., Holady, J.C., 2006. Perchlorate and chlorate in dietary supplements and flavor enhancing ingredients. *Anal. Chim. Acta.* Volume. 567, issue 1. 26-32.

Tikkanen, M. W., 2006. Development of drinking water regulation for perchlorate in California. *Anal. Chim. Acta* 567, 20-25.

Theodorakis, C., Rinhard, J., Anderson, T., Liu, F., Park, J.-W., Costa, F., McDaniel, L., Kendall, R., Waters, A., 2006. Perchlorate in fish from a contaminated site in east-central Texas. *Environ. Pollut.* 139, 59-69.

Ting, D., Howd, R. A., Fan, A. M., Alexeeff, G. V., 2006. Development of a health-protective drinking water level for perchlorate. *Environ. Health Perspect.* volume 114, number 6, June, 881-886

Urbansky, E.T., 2002. Perchlorate as an environmental contaminant. Environ. Sci. Pollut. 9 (3), 187-192.

Urbansky, E.T., Magnuson, M.L., Kelty, C.A., Brown, S.K., 2000. Perchlorate uptake by salt cedar (*Tamarix ramosissima*) in the Las Vegas Wash riparian ecosystem. The Sci. of the Total Environ. 256, 227-232.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. 2002. Perchlorate Environmental Contamination: Toxicological Review and Risk Characterization based on emerging information. Washington, DC 31, January.

US FDA. United State Food and drug administration. 2007. Perchlorate questions and answers. Disponível em: [www.cfsan.fda.gov/~dms/clo4qa.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/clo4qa.html). acessado em 17/01/2008.

Zar, J.H., 1996. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall Internacional Inc., New Jersey.